

①9 BUNDESREPUBLIK  
DEUTSCHLAND



DEUTSCHES  
PATENTAMT

⑫ Übersetzung der  
europäischen Patentschrift

⑧7 EP 0 543 906 M1

⑩ DE 691 25 380 T 2

⑥1 Int. Cl. 6:  
C 07 H 19/067  
C 07 H 21/00

②1 Deutsches Aktenzeichen:	691 25 380.3
⑧6 PCT-Aktenzeichen:	PCT/US91/05227
⑧6 Europäisches Aktenzeichen:	91 915 182.9
⑧7 PCT-Veröffentlichungs-Nr.:	WO 92/02533
⑧6 PCT-Anmeldetag:	24. 7. 91
⑧7 Veröffentlichungstag der PCT-Anmeldung:	20. 2. 92
⑧7 Erstveröffentlichung durch das EPA:	2. 6. 93
⑧7 Veröffentlichungstag der Patenterteilung beim EPA:	26. 3. 97
④7 Veröffentlichungstag im Patentblatt:	28. 8. 97

(4)

③0 Unionspriorität:

558881 27.07.90 US

⑦3 Patentinhaber:

Chiron Corp., Emeryville, Calif., US

⑦4 Vertreter:

Vossius & Partner, 81675 München

⑧4 Benannte Vertragsstaaten:

AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IT, LI, LU, NL,  
SE

⑦2 Erfinder:

URDEA, Michael, S., Alamo, CA 94507, US; HORN,  
Thomas, Berkeley, CA 94708, US

⑤4 DURCH REDUKTION ORTHOGONAL ENTFERNBARE HYDROXYLSCHUTZGRUPPEN UND IHRE  
VERWENDUNG IN DER CHEMISCHEN SYNTHESE VON OLIGONUKLEOTIDEN

Anmerkung: Innerhalb von neun Monaten nach der Bekanntmachung des Hinweises auf die Erteilung des europäischen Patents kann jedermann beim Europäischen Patentamt gegen das erteilte europäische Patent Einspruch einlegen. Der Einspruch ist schriftlich einzureichen und zu begründen. Er gilt erst als eingelegt, wenn die Einspruchsgebühr entrichtet worden ist (Art. 99 (1) Europäisches Patentübereinkommen).

Die Übersetzung ist gemäß Artikel II § 3 Abs. 1 IntPatÜG. 1991 vom Patentinhaber eingereicht worden. Sie wurde vom Deutschen Patentamt inhaltlich nicht geprüft.

DE 691 25 380 T 2

DE 691 25 380 T 2

EP-B-0 543 906

(91 91 5182.9)

CHIRON CORPORATION

u. Z.: EP-3992

DURCH REDUKTION ORTHOGONAL ENTFERNBARE HYDROXYL-  
SCHUTZGRUPPEN UND IHRE VERWENDUNG IN DER CHEMISCHEN SYNTHESE  
VON OLIGONUKLEOTIDEN

Beschreibung

Technisches Gebiet

Die vorliegende Erfindung betrifft allgemein Hydroxyl-Schutzgruppen und insbesondere betrifft sie Hydroxyl-Schutzgruppen, die durch Reduktion mit flüssigen Reduktionsmitteln orthogonal entfernbar sind und die besonders nützlich bei der chemischen Synthese von Oligonukleotiden sind.

Hintergrund

Mit dem Aufkommen der Hybrid-DNA-Technologie und der Explosion der Möglichkeiten, eine große Vielzahl von natürlichen Produkten zu isolieren, zu reinigen und zu untersuchen, besteht ein zunehmender Bedarf an schnellen und effizienten Verfahren zur Herstellung und Reinigung von Oligomeren von Nukleinsäuren und Aminosäuren.

Bei Nukleinsäuren ist es typischerweise notwendig, Sequenzen zur Verwendung als Verbindungsglieder (linker), Adapter, synthetische Gene und synthetische Regulationssequenzen sowie zur Verwendung als Sonden, Primer und dergleichen zu synthetisieren. Es sind viele Verfahren für die Herstellung von Oligomeren von Nukleotiden, oder „Oligonukleotiden“, entwickelt worden. Diese Verfahren beruhen zum größten Teil auf einem einleitenden Anbinden eines ersten Nukleotids an einen festen Träger, gefolgt von der sequenziellen Addition nachfolgender Nukleotideinheiten, wobei jede Addition mehrere chemische Reaktionen einschließt.

Die beiden Hauptverfahren der Oligonukleotidsynthese, die auf dem Fachgebiet gut eingeführt sind, sind die sogenannten „Phosphotriester“- und „Phosphoramidit“-Verfahren (ziemlich ausführlich in den nachstehend zitierten Druckschriften beschrieben). In den häufigsten Schemata für beide Verfahren wächst die Oligonukleotidkette durch nukleophilen Angriff der 5'-OH-Gruppe des immobilisierten Oligomers auf eine aktivierte

3'-Phosphat- oder -Phosphoramiditfunktion eines löslichen 5'-geschützten Nukleotidbausteins. Andere Schlüsselschritte schließen die saure Schutzgruppenentfernung von der 5'-O- (4,4'-Dimethoxytrityl)-Gruppe (DMT) im Phosphotriesterverfahren sowie, im Phosphoramiditverfahren, die Oxidation des Phosphit-Triesters zum Phosphat-Triester ein.

Andere Verfahren der Oligonukleotidsynthese sind ebenfalls bekannt, einschließlich 5'-zu-3'-Synthesen, welche eine  $\beta$ -Cyanoethylphosphat-Schutzgruppe verwenden (De Napoli et al., Gazz. Chim. Ital., **114** (1984), 65; Rosenthal et al., Tetrahedron Letters, **24** (1983), 1691; Belagaje und Brush, Nucleic Acids Res., **10** (1977), 6295; Cramer und Koster, Angew. Chem. Int. Ed. Engl., **7** (1968), 473; und Blackburn et al., J. Chem. Soc. C, (1967), 2438).

Alle diese Verfahren zur Synthese von Oligonukleotiden sind mit der Verwendung von 3'- und 5'-Hydroxyl-Schutzgruppen verbunden. Viele der in der Oligonukleotidsynthese verwendeten Hydroxyl-Schutzgruppen stellen einige Probleme dar. Zum Beispiel ist es offensichtlich wünschenswert, daß eine Hydroxyl-Schutzgruppe „orthogonal“ ist, d.h. mit Reagenzien entfernbare ist, welche den Rest des Moleküls, einschließlich anderer eventuell vorhandener Blockier- oder Schutzgruppen, nicht beeinflussen. Einige der bekannten Hydroxyl-Schutzgruppen sind nicht völlig „orthogonal“. Auch erfordern viele der gegenwärtig verwendeten Hydroxyl-Schutzgruppen, z.B. die Levulinyl-Gruppe, eine Entfernung mit harten Reagenzien (z.B. Säure im Fall der Dimethoxytrityl-Gruppe). Die Notwendigkeit harter Reagenzien kann eine wachsende Oligonukleotidkette schädigen und schränkt darüberhinaus die Zahl und Art der Schutzgruppen, die an anderer Stelle im Molekül während der Synthese eingesetzt werden können, stark ein. Schließlich ist es wünschenswert, daß die Hydroxyl-Schutzgruppe im Bezug auf jegliche Reagenzien, die in den chemischen Reaktionen zu verwenden sind, welche den Rest des Moleküls umfassen, chemisch stabil ist. Es hat sich als schwierig erwiesen, Hydroxyl-Schutzgruppen zu finden, die in gebundener Form während der Verwendung chemisch stabil sind und die noch dazu mit relativ milden Reagenzien leicht zu entfernen sind. Die Erfindung richtet sich auf orthogonale Hydroxyl-Schutzgruppen, die tatsächlich ziemlich stabil sind, solange sie an das geschützte Molekül gebunden sind, die aber dennoch nach der Reaktion mit milden Reagenzien leicht zu entfernen sind. Die vorliegende Erfindung macht Gebrauch von Schutzgruppen, die sich, wenn sie an das geschützte Molekül gebunden sind, in einem oxidierten stabilen Zustand befinden, die aber bei Reduktion labil werden und somit leicht entfernbare sind. Die neuen Hydroxyl-Schutzgruppen können auch verwendet werden, wenn in dem zu schützenden Molekül mehr als eine Hydroxylgruppe vorliegt. Die hier genannten Erfinder fanden, daß diese Schutzgruppen äußerst vielseitig und von unschätzbarem Wert als

Hydroxyl-Schutzgruppen allgemein sowie insbesondere in der chemischen Synthese von Oligonukleotiden sind.

Zusätzlich zu den Druckschriften, die im vorausgehenden Abschnitt zitiert und diskutiert wurden, betreffen die nachstehenden Druckschriften ebenfalls einen oder mehrere Aspekte der vorliegenden Erfindung.

D.S. Kemp et al., Tetrahedron Letters, 12 (1977), 1031-1034, beschreiben die Verwendung von Maq-Estern als Carboxyl-Schutzgruppen, insbesondere zur Verwendung in der chemischen Synthese von Peptiden.

N. Balgobin et al., Chemica Scripta, 20 (1982), 198-200, beschreiben die Verwendung von 2-Oxymethylenanthrachinon als terminale Phosphat-Schutzgruppe in der chemischen Synthese von DNA und RNA.

R.L. Blankespoor et al., J. Org. Chem., 49 (1984), 4441-46, beschreiben die Verwendung des 2-Methylen-9,10-anthrachinon(Maq)-Esters zum Binden einer  $\gamma$ -Aminobuttersäure. Im Brennpunkt steht die Entwicklung eines verbesserten Übermittlungssystems für Neurotransmitter (d.h. etwa  $\gamma$ -Aminobuttersäure (GABA)). Die Autoren erwähnen besonders, daß der Maq-Ester bei Elektroreduktion zu dem entsprechenden Hydrochinon spaltbar ist.

#### Offenbarung der Erfindung

Dementsprechend ist eine vorrangige Aufgabe der Erfindung, Verfahren und Reagenzien zum Schutz von Hydroxylgruppen, besonders während der chemischen Synthese von Oligonukleotiden, bereitzustellen.

Es ist eine andere Aufgabe der Erfindung, orthogonal entfernbare Hydroxyl-Schutzgruppen bereitzustellen, welche durch Reduktion mit einem flüssigen Reduktionsmittel labil und entferntbar gemacht werden.

Es ist noch eine andere Aufgabe der Erfindung, eine multifunktionelle Nukleinsäure bereitzustellen, die an der N4-Position mit einer Oxyalkylen-Einheit  $-(CH_2)_x-OR$  derivatisiert ist, wobei R eine Hydroxyl-Schutzgruppe ist, die hier im einzelnen beschrieben werden wird.

Es ist außerdem eine andere Aufgabe der Erfindung, Oligonukleotidketten bereitzustellen, die solche multifunktionellen Nukleinsäuren enthalten.

Es ist eine weitere Aufgabe der Erfindung, ein Verfahren zum Schutz einer Hydroxylgruppe einer hydroxylhaltigen Verbindung während chemischer Reaktionen anderer in der Verbindung enthaltener funktioneller Gruppen bereitzustellen, welches das Umsetzen der zu schützenden Hydroxylgruppe mit einem Chlorformiat-Derivat der gewünschten Schutzspezies vor derartigen chemischen Reaktionen umfaßt.

Es ist noch eine weitere Aufgabe der Erfindung, ein verbessertes Verfahren zum chemischen Synthetisieren von Oligonukleotiden aus Nukleotid-Monomeren bereitzustellen. Die Verbesserung bezieht sich, wie hier beschrieben wird, auf die Verwendung bestimmter orthogonal entfernbare Hydroxyl-Schutzgruppen.

Es ist außerdem eine weitere Aufgabe der Erfindung, ein Verfahren zum Erzeugen einer verzweigten Oligonukleotid-Struktur bereitzustellen, welches das Derivatisieren eines linearen Oligonukleotids an der N4-Position von Cytosinresten mit sekundären Oligonukleotidketten umfaßt, wobei während der Synthese die erfindungsgemäßen orthogonal entfernbaren Hydroxyl-Schutzgruppen an den „N4-Verzweigungspunkten“ verwendet werden.

Die vorliegende Erfindung stellt Verfahren zum Schutz von Hydroxylgruppen mittels orthogonal entfernbare reduzierbare Schutzgruppen bereit, wie in den begleitenden Patentansprüchen dargelegt ist. Die vorliegende Erfindung stellt auch multifunktionelle Nukleinsäuren mit einer geschützten Hydroxylgruppe, Oligonukleotidketten, die eine oder mehrere solcher Nukleinsäuren enthalten, sowie Verfahren zum Synthetisieren von Oligonukleotiden unter Verwendung der Schutzgruppen bereit, wie desweiteren in den begleitenden Patentansprüchen dargelegt ist.

Die Begriffe „Oligonukleotid“ und „Polynukleotid“, wie sie hier verwendet werden, sollen allgemein für Polydesoxyribonukleotide (enthaltend 2'-Desoxy-D-ribose oder modifizierte Formen davon), Polyribonukleotide (enthaltend D-Ribose oder modifizierte Formen davon) und für jede andere Art von Polynukleotid, bei welchem es sich um ein N-Glykosid einer Purin- oder Pyrimidin-Base oder einer modifizierten Purin- oder Pyrimidin-Base handelt, stehen. Der Begriff „Nukleosid“ steht in ähnlicher Weise allgemein für Ribonukleoside, Desoxyribonukleoside oder jedes andere Nukleosid, bei welchem es sich um ein N-Glykosid einer Purin- oder Pyrimidin-Base oder einer modifizierten Purin- oder Pyrimidin-Base handelt. Es gibt keine beabsichtigte Unterscheidung in der Länge zwischen dem Begriff „Oligonukleotid“ und „Polynukleotid“ und diese Begriffe werden austauschbar verwendet. Diese Oligonukleotide und Polynukleotide können einzelsträngig oder

doppelsträngig sein, typischerweise einzelsträngig. Auch bestehen die Oligonukleotide der vorliegenden Erfindung normalerweise aus etwa 2 bis etwa 2000 Monomer-Einheiten und, für die meisten Anwendungen auf Sondenbasis, typischer aus etwa 2 bis 100 Monomer-Einheiten.

„Derivatisierbare“ Nukleotide, wie hier verwendet, sind Nukleotide, die so modifiziert sind, daß sie an der 4-Position eines Pyrimidins, z.B. Cytosin, eine funktionelle Gruppe einschließen, die mit der hier beschriebenen Schutzspezies reagieren kann, und die darüberhinaus verwendet werden kann, um die Synthese sekundärer Oligonukleotidketten bei der Herstellung verzweigter Oligonukleotid-Strukturen einzuleiten. Ein Beispiel eines derivatisierbaren Nukleotids ist eines, das an der 4-Position mit einer Oxyalkylen-Einheit modifiziert wurde, so daß eine freie Hydroxylgruppe an dieser Stellung des Moleküls vorliegt.

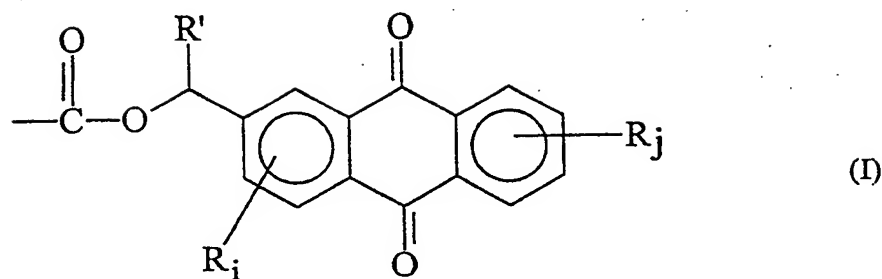
Eine Hydroxylgruppe, die „geschützt“ ist, ist eine, die mit einer schützenden Einheit derart umgesetzt wurde, daß die resultierende geschützte Gruppe während des Syntheseschrittes oder der Schritte, bei denen die Schutzgruppe vorhanden ist, keiner unerwünschten chemischen Reaktion zugänglich ist. Mit „Stabilität“ der hydroxylgeschützten Verbindung oder der Hydroxyl-Schutzgruppe, sofern sie kovalent an die hydroxylhaltige Verbindung gebunden ist, ist die weitgehende Abwesenheit sterischer Wechselwirkung sowie inhärente chemische Stabilität, d.h. Resistenz gegen Angriffe und/oder Abbau, gemeint.

Mit „Niederalkylresten“ und „Niederalkoxyresten“ sind Alkyl- beziehungsweise Alkoxy-Substituenten mit 1 bis 8, typischer mit 1 bis 6 Kohlenstoffatomen gemeint.

Wo aromatische Substituenten gezeigt sind, ist es selbstverständlich, daß jeder einzelne aromatische Ring an einem oder mehreren Kohlenstoffatomen mit Einheiten substituiert sein kann, welche sich nicht nachteilig auf Funktion oder Reaktivität auswirken.

## 2. Schutz von Hydroxylgruppen:

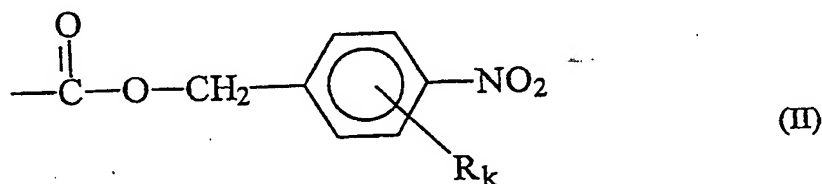
Das erfindungsgemäße Verfahren ist somit nützlich zum Schutz einer freien Hydroxylgruppe einer hydroxylhaltigen Verbindung, um so die Hydroxyl-Funktion während chemischer Reaktionen oder chemischer Umwandlungen anderer im Molekül vorliegender Funktionen zu erhalten. Allgemein ausgedrückt, wird die zu schützende Hydroxylgruppe mit einer Schutzspezies umgesetzt, um eine Einheit -OR entstehen zu lassen. Entsprechend einem ersten Aspekt der Erfindung kann R durch die Strukturformel (I) dargestellt werden:



in der R' ein Wasserstoffatom, ein Aryl- oder Aralkylrest ist, die Reste Ri gleich oder verschieden sein können und aus der Reihe Aminogruppe, Nitrogruppe, Halogenatom, Hydroxylgruppe, C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>-Alkyl- und C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>-Alkoxyreste ausgewählt sind; die Reste Rj gleich oder verschieden sein können und aus der Reihe Aminogruppe, Nitrogruppe, Halogenatom, Hydroxylgruppe, C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>-Alkyl- und C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>-Alkoxyreste ausgewählt sind; i 0, 1, 2 oder 3 ist; und j 0, 1, 2, 3 oder 4 ist.

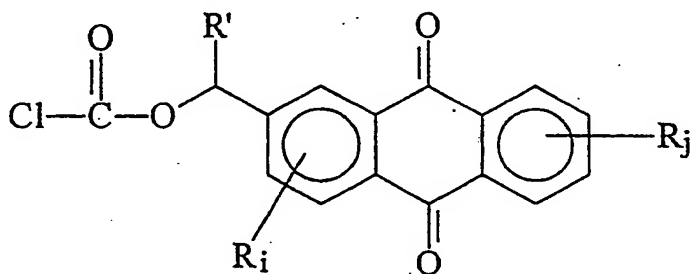
In dieser Struktur steht R' vorzugsweise für ein Wasserstoffatom oder eine Phenylgruppe. Die Reste Ri und Rj können, wie angegeben, irgendeinen aus einer Anzahl verschiedener Substituenten darstellen. Die Substituenten können ausgewählt werden, um die schützende Einheit leichter reduzierbar und somit einfacher von der geschützten Hydroxylfunktion entfernenbar zu machen. Alternativ können Substituenten gewählt werden, die die Gruppe schwerer entfernenbar und somit im gebundenen Zustand stabiler machen. Substitution an den 1-, 4-, 5- und/oder 8-Positionen verursacht den größten Effekt.

Gemäß einem zweiten Aspekt der Erfindung hat R die Formel:

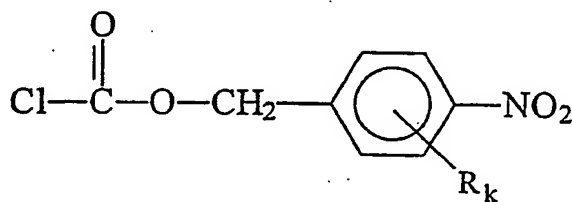


in der k 0, 1, 2, 3 oder 4 ist; und die Reste Rk gleich oder verschieden sein können und aus der Reihe Aminogruppe, Nitrogruppe, Halogenatom, Hydroxylgruppe, C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>-Alkyl- und C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>-Alkoxyreste ausgewählt sind. Ein bevorzugtes Beispiel einer solchen Spezies ist die p-Nitrobenzylgruppe.

Die zu schützende freie Hydroxylgruppe wird mit einer schützenden Spezies, wie soeben beschrieben, vorzugsweise durch Reaktion mit dem Chlorformiat-Derivat derivatisiert. Das heißt, um für eine Schutzgruppe zu sorgen, bei der es sich um Maq oder ein Maq-Derivat handelt, würde die Umsetzung zwischen der hydroxylhaltigen Verbindung und dem nachstehenden Chlorformiat durchgeführt werden:



Wenn R eine p-Nitrobenzylgruppe oder ein Derivat davon ist, würde die Umsetzung wiederum vorzugsweise mit dem nachstehenden Chlorformiat durchgeführt werden:



Die Umsetzung wird vorzugsweise in einem wasserfreien Lösungsmittel bei einer relativ niedrigen Temperatur, d.h. niedriger als etwa 20°C, stärker bevorzugt bei oder unterhalb von etwa 0°C, durchgeführt. Die Chlorformiat-Derivate selbst können leicht aus dem Hydroxymethyl-Analogen mit Triphosgen synthetisiert werden.

Obwohl diese reduzierbaren Hydroxyl-Schutzgruppen in Verbindung mit einer großen Vielzahl von Molekülstrukturen und Syntheseschritten verwendet werden können, wurde gefunden, daß sie besonders nützlich in der chemischen Synthese von Oligonukleotiden sind, einschließlich kurzer Oligonukleotidketten, welche für sondenartige Anwendungen nützlich sind, sowie längerer und/oder komplexerer, z.B. verzweigter Oligonukleotid-Strukturen. Die hier genannten Erfinder fanden, daß diese reduzierbaren Hydroxyl-Schutzgruppen eine hervorragende Alternative zu der Dimethoxytrityl(DMT)- und der Pixylgruppe an der 5'-Hydroxylposition sind. Die Verwendung an der 3'-Hydroxylposition entweder eines Nukleotids oder einer Oligonukleotidkette ist ebenfalls möglich.

Eine weitere Anwendung der erfindungsgemäßen Hydroxyl-Schutzgruppen, wie sie nachstehend genauer beschrieben wird, ist das Blockieren einer exocyclischen Hydroxyl-



gruppe, die an der N4-Position eines 5-Methylcytosin-Restes vorliegt. Eine Schutzgruppe ist in einer solchen Struktur erforderlich, wenn die N4-Positionen von Cytosinresten, d.h. in einer Oligonukleotidkette enthaltene, als Verzweigungspunkte für die Synthese sekundärer Oligonukleotidketten orthogonal zur Hauptkette des Ausgangsmaterials verwendet werden.

Während mehrere der vorstehend zitierten und diskutierten Referenzen die Verwendung reduzierbarer Schutzgruppen für Phosphat- oder Carboxyl-Einheiten offenbaren, ist die Verwendung solcher Strukturen zum Schutz von Hydroxylspezies neu und sorgt für einige wichtige und herausragende Vorteile. Als erstes können relativ milde Reagenzien verwendet werden, um die gebundene Schutzgruppe zu reduzieren und sie somit labil und entfernbare zu machen. Im Falle von Maq kann beispielsweise Dithionit verwendet werden. Dies steht im Gegensatz zum Bedarf eines Reagens wie Säure, welches erforderlich ist, wenn die Dimethoxytritylgruppe zum Schutz von Hydroxylgruppen verwendet wird. Die Möglichkeit, milde Reagenzien zu verwenden, minimiert die Wahrscheinlichkeit eines Schadens an der zu synthetisierenden Oligonukleotidstruktur. Diese reduzierbaren Schutzgruppen sind auch insofern orthogonal, als sie ziemlich spezifisch und nicht chemisch anfällig gegen die meisten chemischen Reagenzien sind, sofern sie nicht reduziert werden. Diese reduzierbaren Schutzgruppen wiederum funktionieren durch Bindung an die zu schützende Hydroxylgruppe in einem oxidierten, chemisch sehr stabilen Zustand, aber sie werden labil gemacht, wenn sie reduziert werden. Im Falle des Maq-Esters wird beispielsweise erwartet, daß die Spaltung an der Esterposition bei der Hydrochinonform schnell verläuft (siehe z.B. D. S. Kemp et al., vorstehend zitiert), wogegen in der Chinonform Resistenz gegen die Spaltung erwartet wird. Schließlich sollte ein zusätzlicher und entscheidend wichtiger Vorteil besonders erwähnt werden. Dieser besteht darin, daß die Verwendung dieser Hydroxyl-Schutzgruppen in der DNA-Synthese, wenn ein säureempfindlicher Schutz angewandt wird, die Wahrscheinlichkeit einer Depurinierung wesentlich verringert und somit den entsprechenden großen Ausbeuteverlust beseitigt. Dies ist ein bedeutender Vorteil für alle hier diskutierten Anwendungen in der DNA-Synthese sowie für andere Anwendungen, die von Fachleuten beim Lesen der vorliegenden Offenbarung ins Auge gefaßt werden könnten.

### 3. Chemische Synthese von Oligonukleotiden unter Verwendung orthogonal entferntbarer Hydroxyl-Schutzgruppen:

Wie vorstehend erwähnt, besteht eine wichtige Anwendung der vorliegenden Hydroxyl-Schutzgruppen und Verfahren in der chemischen Synthese sowohl linearer als auch verzweigter Oligonukleotide. Wie derzeit auf dem Fachgebiet bekannt ist, umfassen Verfahren zur Synthese von Oligonukleotiden typischerweise die aufeinanderfolgende Addition

von 3'-blockierten und 5'-blockierten Nukleotid-Monomeren an die terminale 5'-Hydroxylgruppe einer wachsenden Oligonukleotidkette, wobei jede Addition durch nukleophilen Angriff der terminalen 5'-Hydroxylgruppe der wachsenden Kette auf die 3'-Position des addierten Monomers, welches typischerweise ein Phosphorderivat, etwa ein Phosphotriester, Phosphoramidit oder dergleichen, ist, bewirkt wird. Derartige Verfahren sind im einzelnen in den Druckschriften, welche hier im Abschnitt „Hintergrund“ zitiert und diskutiert wurden, beschrieben.

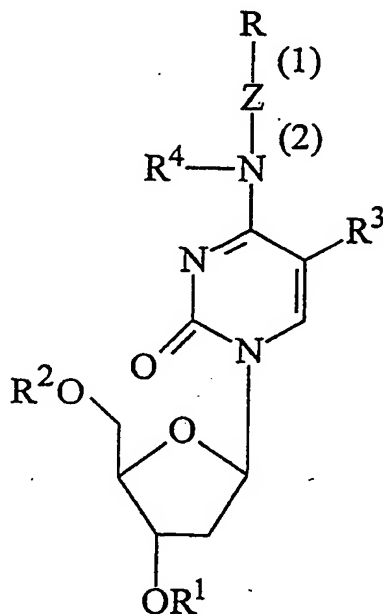
Ein anderer Aspekt der Erfindung schließt daher die Verwendung orthogonal entfernbare, reduzierbare Hydroxyl-Schutzgruppen entweder als 3'- oder als 5'-blockierende Gruppen oder beides ein. Die Verwendung der reduzierbaren Schutzgruppen erfolgt bevorzugt an der 5'-Position als eine Alternative zu den bekannten Schutzeinheiten Dimethoxytrityl und Pixyl.

Die erfindungsgemäßen Hydroxyl-Schutzgruppen sind außerdem nützlich bei der Erzeugung verzweigter Oligonukleotid-Strukturen, z.B. Nukleinsäure-Multimere, die in „amplifizierten“ Nukleinsäure-Hybridisierungstests nützlich sind, wie in der europäischen Patentanmeldung EP-A-0317077 der hier genannten Patentanmelder beschrieben. Wie in jener Patentanmeldung beschrieben ist, wird die N4-Position eines Cytosinrestes innerhalb einer Oligonukleotidkette so modifiziert, daß sie eine Oxyalkyleneinheit enthält, welche dann derivatisiert werden kann, um sekundäre Oligonukleotidketten in verzweigter Struktur zu erzeugen. Die Patentanmeldung, auf die Bezug genommen wurde, beschreibt die Verwendung der Levulinygruppe als Hydroxyl-Schutzeinheit an der N4-Position (die Levulinygruppe erfordert das Entfernen mit Hydrazin oder einem ähnlichen Reagenz, welches eine Destabilisierung verursachen kann).

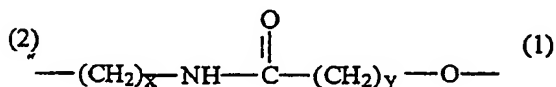
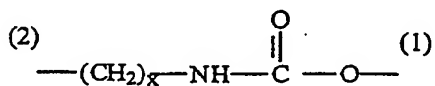
Im vorliegenden Verfahren wird die verzweigte Oligonukleotid-Struktur erzeugt, indem zunächst eine Oligonukleotidkette bereitgestellt wird, deren Cytosinreste zu  $-(CH_2)_x-OR$ -Einheiten N4-derivatisiert wurden, wobei R wie vorstehend definiert ist, die 3'- und 5'-terminalen Hydroxylgruppen der Kette mit einem Schutz versehen werden, die Hydroxyl-Schutzgruppen R durch Behandeln mit einem flüssigen Reduktionsmittel entfernt werden, wodurch freie Hydroxylgruppen, die über eine Alkylen-Verknüpfungsgruppe an die N4-Position gebunden sind, entstehen, und indem schließlich sekundäre Oligonukleotidketten an den freien Hydroxylgruppen, welche dann als Verzweigungspunkte dienen, synthetisiert werden.

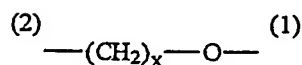
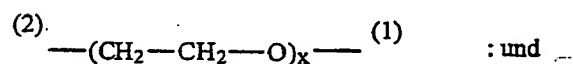
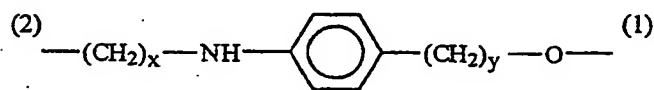
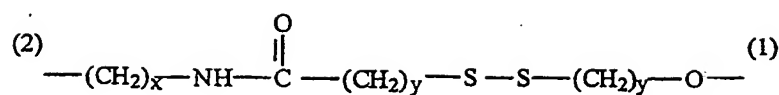
4. Multifunktionelle Nukleinsäuren und diese enthaltende Oligonukleotide:

In einer anderen Ausführungsform schließt die vorliegende Erfindung multifunktionelle Nukleinsäuren ein, die so derivatisiert wurden, daß sie die Einheit  $-(CH_2)_x-OR$ , in der R wie vorstehend definiert ist, an der N4-Position enthalten, sowie Oligonukleotide, die solche derivatisierten multifunktionellen Nukleinsäuren enthalten. Die multifunktionellen Nukleinsäuren haben die Struktur



wobei R eine Hydroxyl-Schutzgruppe der wie vorstehend definierten Formel (I) oder (II) ist, welche durch Reduktion mit einem flüssigen Reduktionsmittel entfernt und ersetzt werden kann, ohne  $R^1$  oder  $R^2$  anzugreifen;  $R^1$  ein Phosphorderivat ist, das die Addition von Nukleotiden an die 5'-Position einer Oligonukleotidkette während der chemischen Synthese ermöglicht;  $R^2$  eine Schutzgruppe ist, die im allgemeinen basestabil und säureempfindlich ist;  $R^3$  aus der aus Wasserstoffatom, Methylgruppe, J, Br und F bestehenden Reihe ausgewählt wird;  $R^4$  ein Wasserstoffatom oder eine Methylgruppe ist; und Z aus der Reihe

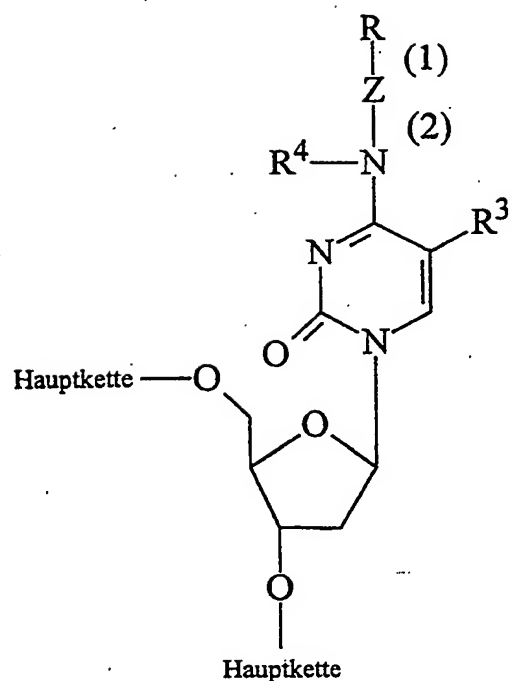




ausgewählt wird, wobei x und y gleich oder verschieden sein können und ganze Zahlen im Bereich von 1 bis einschließlich 8 sind. (Die Bezeichnungen „(1)“ und „(2)“ an der Z-Verknüpfung weisen auf die Orientierung der Verknüpfungseinheit Z hin.)

In dieser Struktur wird bevorzugt, daß Z für  $-(\text{CH}_2)_x-$  steht,  $\text{R}^1$  ein Phosphoramidit, ein Phosphodiester oder ein Phosphotriester ist, während in ähnlicher Weise bevorzugt wird, daß  $\text{R}^2$  eine Dimethoxytrityl- oder Pixylgruppe ist. R ist, wie durchweg in der vorliegenden Patentanmeldung beschrieben, eine orthogonal entfernbare Hydroxyl-Schutzgruppe, die mit einem flüssigen Reduktionsmittel reduzierbar ist, wodurch eine labile, leicht zu entfernende Spezies entsteht.

Oligonukleotidketten, die diese modifizierten Cytosinreste, d.h. wie eben beschriebene derivatisierte modifizierte Nukleotide, enthalten, haben demnach die Struktur



in der R, R<sup>3</sup>, R<sup>4</sup>, Z, x und y wie vorstehend definiert sind.

### Beispiel 1

Verwendung von Carbonatestern von 2-(Hydroxymethyl)-Anthrachinon (MAC, abgeleitet von Methoxyanthrachinon-oxycarbonyl) zum Schutz exocyclischer Alkyl-Hydroxylgruppen in verzweigenden Monomeren

Die Einheit MAQ (Methoxyanthrachinon) wurde verwendet zum Schutz von:  
a) Carbonsäuren als MAQ-Ester (MAC; D.S. Kemp und J. Reczek, Tetrahedron Letters 12 (1977), 1031-1034); b) Aminen als MAQ-Urethane (R.L. Blankespoor, A.N.K. Law und L.L. Miller, Journal of Organic Chemistry 49 (1984), 4441-4446); und c) Phosphatdiestern als MAQ-Phosphotriester (N. Balgobin, M. Kwaitkowski und J. Chattopadhyaya, Chemica Scripta 20 (1982), 198-200).

Die Entfernung der Schutzgruppen von den MAC-Carbonatestern wird durch Behandeln mit Natriumdithionit unter neutralen Bedingungen bewirkt. Die MAC-Gruppe ist orthogonal zu anderen in der chemischen DNA-Synthese verwendeten Schutzgruppen (PG),

d.h. sie kann unter Bedingungen entfernt werden, die andere verwendete Schutzgruppen (siehe Tabelle) nicht destabilisieren, zudem schädigt die Natriumdithionit-Lösung nicht die nativen DNA-Basen. Über die Verwendung von MAC zum Schutz von Hydroxylgruppen wurde nicht berichtet. Die milden Bedingungen für ihre Entfernung können sie für den Schutz von 5'-Hydroxylgruppen in der DNA- und RNA-Synthese nützlich machen.

2-(Hydroxymethyl)anthrachinon wird mit Triphosgen in das entsprechende Chlorformiat (MAC-Cl) umgewandelt. Das MAC-Cl reagiert spezifisch mit der primären Hydroxylgruppe von N-4-(6-Hydroxyhexyl)-5'-DMT-5-methyl-2'-desoxycytidin.

Die Synthesebedingungen zum Herstellen großer Mengen (25 Millimol-Bereich) wurden ausgearbeitet und die Synthese verzweigter DNA-Moleküle wurde durchgeführt.

Tabelle 1  
Stabilität ausgewählter Schutzgruppen

Ausbeuten sind in % angegeben, wobei 100 % laut Beurteilung durch TLC-Analyse nach 1 und 18 Stunden auf keine Schutzentfernung und/oder Modifizierung hinweist. Die Natriumdithionit-Lösung wurde hergestellt, indem 1 g festes Natriumdithionit in 20 ml 1 M Triethylammoniumbicarbonat-Lösung gelöst wurde, gefolgt von der Zugabe von 20 ml Dioxan.

<u>Funktion in DNA</u>	<u>1 Stunde</u>	<u>18 Stunden</u>
Succinat	100	100
A (Benzyl)	100	>95
C (Benzyl)	100	>90
G (Isobutyl)	100	100
T	100	100
BM2 ( ungeschütztes MAC)	100	100
BM2 (Levulinyl)	100	100
P-O-cyanoethyl	>85	< 5
P-O-methyl	100	>95

Herstellung von 2-Anthrachinon-methoxychlorformiat (MAC-Cl):

Eine 0,1 molare Lösung von 2-(Hydroxymethyl)anthrachinon (MAQ-OH) wurde durch Auflösen von 25 mmol (5,95 g) der Verbindung in 250 ml Dioxan hergestellt. Die gelbe Lösung wurde filtriert und das Lösungsmittel durch Verdampfen entfernt, um Wasser zu beseitigen. Der Rückstand wurde in 200 ml Dioxan wieder aufgelöst und Pyridin (2 ml; 25 mmol) wurde zugesetzt. Diese Lösung wurde bei 0°C tropfenweise zu einer gerührten Lösung von Triphosgen (2,5 g; 25 Meq) in 50 ml CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> gegeben. Nach beendeter Zugabe wurde das Gemisch bei 20°C 18 Stunden gerührt. Das Gemisch wurde mit 800 ml Ethylacetat verdünnt und die organische Phase wurde mit 3 x 600 ml 80 %-iger gesättigter wässriger NaCl-Lösung gewaschen. Nach dem Trocknen der organischen Phase über Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> wurde das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt, wobei ein gelber Feststoff anfiel, der in CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (250 ml; 0,1 M) gelöst wurde. Diese Lösung wurde ohne weitere Reinigung verwendet.

Herstellung von 5'-DMT-N-4-(O-2-anthrachinon-methoxycarbonyl-6-oxyhexyl)-5-methyl-2'-desoxycytidin-3'-P-N,N-diisopropylmethylphosphoramidit („E-Base“ oder „E“):

Zu einer wie vorstehend beschrieben (Horn und Urdea, Nucleic Acids Research 17 (1989), 6959-6967) hergestellten Lösung von N-4-(6-Hydroxyhexyl)-5'-DMT-5-methyl-2'-desoxycytidin (17 mmol) in 200 ml Methylenchlorid wurde Pyridin (40 mmol) gegeben und das Gemisch wurde auf 0°C abgekühlt. Eine Lösung von MAC-Cl (20 mmol) in 200 ml CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> wurde tropfenweise zugegeben und 10 Minuten gerührt. Die TLC-Analyse (Silica-Platten, entwickelt mit 10 % Methanol/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>) zeigte, daß das Ausgangsmaterial vollständig verbraucht war. Das Reaktionsgemisch wurde mit 400 ml Ethylacetat verdünnt und die organische Phase wurde mit 2 x 300 ml 5 %-iger NaHCO<sub>3</sub>-Lösung und 80 %-iger gesättigter wässriger NaCl-Lösung extrahiert. Nach dem Trocknen der organischen Phase über Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> für 30 Minuten und anschließender Filtration wurde das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Das Produkt wurde durch Silicagelchromatographie unter Verwendung eines Methanolgradienten (0-6 %) in CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> gereinigt, wobei 13 g reines Produkt erhalten wurden (85 % Ausbeute).

Das Nukleosid N-4-(O-Anthrachinon-methoxycarbonyl-6-oxyhexyl)-5'-DMT-5-methyl-2'-desoxycytidin (14,4 mmol) wurde in CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (50 ml), das 70 mmol DIPEA enthielt, gelöst. Nach dem Abkühlen auf 0°C wurde N,N-Diisopropylaminomethoxychlorphosphin (2,72 ml; 14 mmol) zugesetzt. Das Phosphitylierungsmittel wurde in kleinen Portionen zugegeben, bis 95 % des Ausgangsmaterials verbraucht waren. Das Reaktionsgemisch wurde dann mit Ethylacetat (300 ml) verdünnt, mit 2 x 300 ml 5 %-iger NaHCO<sub>3</sub>-Lösung und dann mit 2 x 300 ml 80 %-iger gesättigter wässriger NaCl-Lösung

extrahiert und schließlich über festem  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  getrocknet. Das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernt.

Das rohe Phosphoramidit wurde durch Silicagelchromatographie unter Verwendung des Lösungsmittelsystems Methylenchlorid/Ethylacetat/Triethylamin (49:49:2 V/V) gereinigt und die produkthaltigen Fraktionen wurden gesammelt und konzentriert. Nach der gemeinsamen Verdampfung mit Toluol wurde das gereinigte Phosphoramidit in Toluol gelöst und unter schnellem Rühren zu 800 ml kaltem Hexan ( $-50^\circ\text{C}$ ) gegeben. Der erhaltene Niederschlag wurde rasch durch Filtration gesammelt und im Hochvakuum 18 Stunden getrocknet, wobei 12,4 g eines leicht gelben Feststoffes anfielen (81 % Ausbeute). NMR  $^{31}\text{P}$  :  $\delta$  145 ppm.

Ein DNA-Oligomer wurde auf einem 3000 A CPG-Träger (40 mg) mit der Sequenz 3'-TCC-GTA-TCC-TGG-GCA-CAG-TTE (MAC)<sub>15</sub> synthetisiert, wobei das Programm mit dem Standardbereich 1 Mikromol verwendet wurde und wobei Methylphosphoramidit auf ABI 380B verwendet wurde. Der Träger wurde danach 30 Minuten mit einer Lösung von 1 g  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$  in 20 ml 1 M TEAB / 10 ml Dioxan behandelt, um die MAC-Gruppe zu entfernen. Nach dem Filtrieren und Waschen mit Wasser und  $\text{CH}_3\text{CN}$  wurde der feste Träger getrocknet. Die Sekundärsynthese zum Einführen der sekundären Sequenz „X“ wurde auf ABI 380B durchgeführt, wobei ein spezieller zweifacher Kondensationszyklus verwendet wurde, um 15 identische Kopien der Sequenz 3'-GTC-AGT-5' („X“) einzuführen. Während der Synthese wurde das Entfernen von DMT mit 3 % DCA in Toluol / 3 % TCA in  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (1:1 V/V) unter Verwendung einer hohen Fließgeschwindigkeit erreicht. Die vollständige Schutzgruppenentfernung von der an 15 Sekundärstellen verzweigten DNA wurde mit 3 % DCA in Toluol zum Entfernen der DMT-Gruppen und Thiophenol / TEA / Dioxan zum Entfernen der Methylgruppen von Phosphortriestern an dem feststoffgestützten Fragment erreicht. Das Fragment wurde mit  $\text{NH}_4\text{OH}$  bei  $20^\circ\text{C}$  während 1 Stunde freigesetzt und exocyclische N-Schutzgruppen wurden mit heißem  $\text{NH}_4\text{OH}$  bei  $60^\circ\text{C}$  während 18 Stunden entfernt. Nach dem Entfernen des flüchtigen Lösungsmittels wurde das Produkt mit PAGE analysiert.

Analog dazu wurde, wenn N-4-(O-Levuliny-6-oxyhexyl)-5-methyl-2'-desoxycytidin verwendet wurde, die Levulinygruppe vor der Sekundärsynthese mit einer Lösung von 0,5 M Hydrazinhydrat in Pyridin / Essigsäure (4:1 V/V) während 90 Minuten entfernt.



EP-B-0 543 906

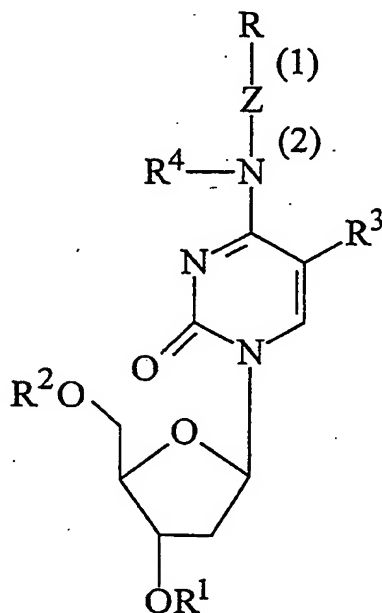
(91 91 5182.9)

CHIRON CORPORATION

u. Z.: EP-3992

### PATENTANSPRÜCHE

1. Multifunktionelle Nucleinsäure mit der Struktur:



wobei

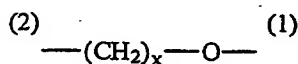
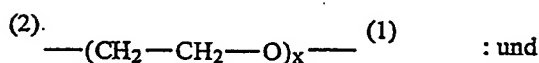
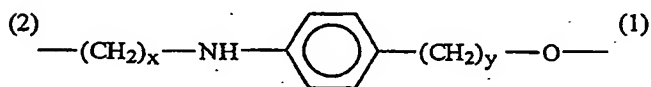
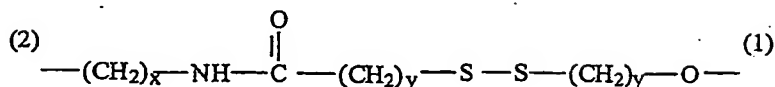
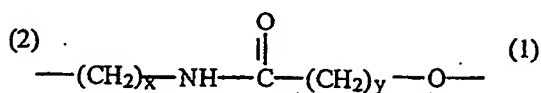
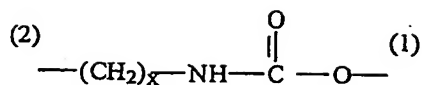
R<sup>1</sup> ein Phosphorderivat ist, das die Addition von Nucleotiden an die 5'-Position einer Oligonucleotidkette während der chemischen Synthese ermöglicht;

R<sup>2</sup> eine Schutzgruppe ist, die im allgemeinen basenstabil und säureempfindlich ist;

R<sup>3</sup> ausgewählt ist aus Wasserstoffatom, Methylgruppe, J, Br<sup>-</sup> und F;

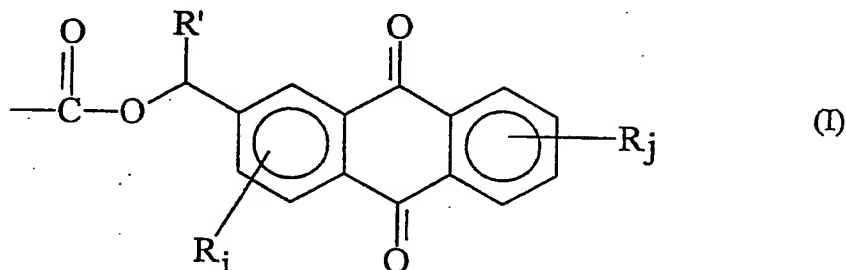
R<sup>4</sup> ein Wasserstoffatom oder eine Methylgruppe ist;

Z ausgewählt ist aus



wobei x und y gleich oder verschieden sein können und ganze Zahlen im Bereich von 1 bis einschließlich 8 sind; und

R entweder ein Rest der Formel (I) ist:



in der

R' ein Wasserstoffatom, ein Aryl- oder Aralkylrest ist;

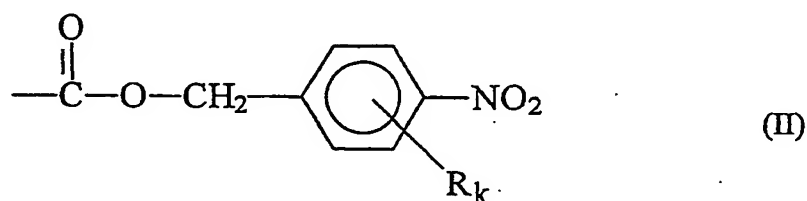
die Reste R<sub>i</sub> gleich oder verschieden sein können und ausgewählt sind aus Amino-  
gruppe, Nitrogruppe, Halogenatom, Hydroxylgruppe, C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>-Alkyl- und C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>-Alkoxyrest;

die Reste R<sub>j</sub> gleich oder verschieden sein können und ausgewählt sind aus Amino-  
gruppe, Nitrogruppe, Halogenatom, Hydroxylgruppe, C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>-Alkyl- und C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>-Alkoxyrest;

i 0, 1, 2 oder 3 ist; und

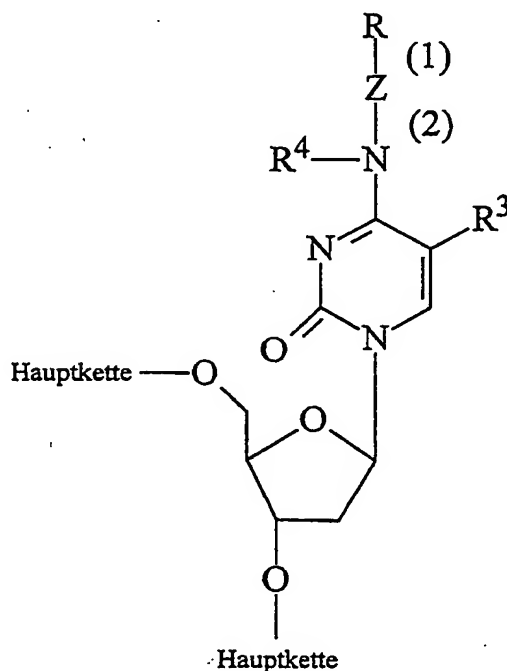
j 0, 1, 2, 3 oder 4 ist;

oder R ein Rest der Formel (II) ist:



in der:

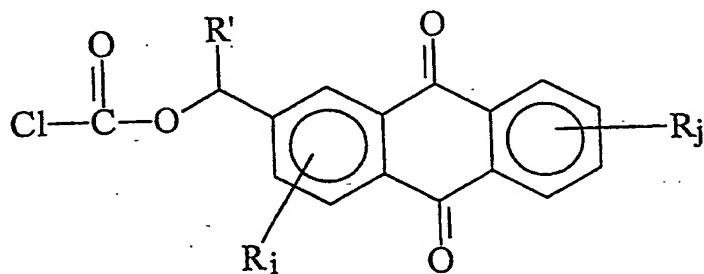
- k 0, 1, 2, 3 oder 4 ist; und
- die Reste  $R_k$  gleich oder verschieden sein können und ausgewählt sind aus Amino-  
gruppe, Nitrogruppe, Halogenatom, Hydroxylgruppe,  $C_1$ - $C_8$ -Alkyl- und  $C_1$ - $C_8$ -Alkoxyrest.
2. Multifunktionelle Nucleinsäure nach Anspruch 1, wobei  $R^1$  ein Phosphoramidit, ein  
Phosphodiester oder ein Phosphotriester ist.
3. Multifunktionelle Nucleinsäure nach Anspruch 1 oder 2, wobei  $R^2$  eine  
Dimethoxytrityl- oder Pixylgruppe ist.
4. Multifunktionelle Nucleinsäure nach Anspruch 1, wobei R ein Rest der Formel (I) ist,  
 $R'$  ein Wasserstoffatom oder eine Phenylgruppe ist und i und j beide 0 sind.
5. Multifunktionelle Nucleinsäure nach Anspruch 1, wobei R ein Rest der Formel (I) ist,  
 $R'$  ein Wasserstoffatom ist und i und j beide 0 sind.
6. Multifunktionelle Nucleinsäure nach Anspruch 1, wobei R ein Rest der Formel (II) ist  
und wobei die Reste  $R_k$  Wasserstoffatome sind.
7. Oligonucleotidkette, die mindestens einen modifizierten Cytosinrest enthält, welcher  
jeweils die Struktur



hat, wobei  $R$ ,  $R^3$ ,  $R^4$  und  $Z$  wie in Anspruch 1 definiert sind.

8. Oligonucleotidkette nach Anspruch 7, wobei  $R$  ein Rest der Formel (I) ist, gemäß der Definition in Anspruch 1.

9. Verfahren zum Schutz einer Hydroxylgruppe einer hydroxylhaltigen Verbindung während der chemischen Umwandlung anderer Einheiten darin, umfassend das Umsetzen der Verbindung vor der chemischen Umwandlung mit einer schützenden Spezies der Struktur



in der:

$R'$  ein Wasserstoffatom, ein Aryl- oder Alkylrest ist;

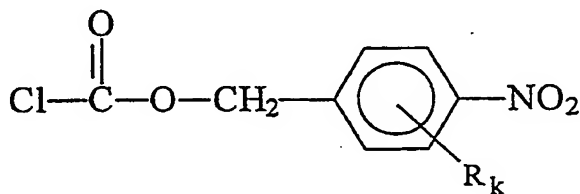
die Reste  $R_i$  gleich oder verschieden sein können und ausgewählt sind aus Amino-  
gruppe, Nitrogruppe, Halogenatom, Hydroxylgruppe,  $C_1$ - $C_8$ -Alkyl- und  $C_1$ - $C_8$ -Alkoxyrest;

die Reste  $R_j$  gleich oder verschieden sein können und ausgewählt sind aus Amino-  
gruppe, Nitrogruppe, Halogenatom, Hydroxylgruppe,  $C_1$ - $C_8$ -Alkyl- und  $C_1$ - $C_8$ -Alkoxyrest;

$i$  0, 1, 2 oder 3 ist; und

$j$  0, 1, 2, 3 oder 4 ist.

10. Verfahren zum Schutz einer Hydroxylgruppe einer hydroxylhaltigen Verbindung während der chemischen Umwandlung anderer darin enthaltener funktioneller Gruppen, umfassend das Umsetzen der Verbindung vor der chemischen Umwandlung mit einer schützenden Spezies der Struktur



in der:

$k$  0, 1, 2, 3 oder 4 ist; und

die Reste  $R_x$  gleich oder verschieden sein können und ausgewählt sind aus Amino-  
gruppe, Nitrogruppe, Halogenatom, Hydroxylgruppe,  $C_1-C_8$ -Alkyl- und  $C_1-C_8$ -Alkoxyrest.

11. Verfahren zur Herstellung von Oligonucleotiden aus Nucleotid-Monomeren durch sequentielle Addition eines 3'-blockierten und 5'-blockierten Nucleotid-Monomeren an die terminale 5'-Hydroxylgruppe der wachsenden Oligonucleotidkette, wobei das Verfahren den Einsatz einer wie in Anspruch 1 definierten Einheit R der Formel (I) oder (II) als 3'-Blockierungsgruppe oder als 5'-Blockierungsgruppe umfaßt.

12. Verfahren nach Anspruch 11, wobei die Blockierungsgruppe die Formel (I) hat.

13. Verfahren zur Erzeugung einer verzweigten Oligonucleotid-Struktur, umfassend das Versehen der 3'- und 5'-terminalen Hydroxylgruppen einer Oligonucleotidkette gemäß Anspruch 7 mit einem Schutz, Entfernen der Einheiten R durch Behandlung mit einem flüssigen Reduktionsmittel, um freie Hydroxylgruppen zu erhalten, die über eine Alkylen-Verknüpfungsgruppe an die N-4-Positionen gebunden sind, und Synthetisieren sekundärer Oligonucleotidketten an den freien Hydroxylgruppen.

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**